

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-505234

(43) 公表日 平成10年(1998)5月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z NA	C 1 2 N 15/00	Z NAA
A 6 1 K 48/00	AAB	A 6 1 K 48/00	AAB
// A 6 1 K 35/76		35/76	
38/00		39/395	N
38/22		C 0 7 K 14/475	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に統ぐ

(21) 出願番号	特願平8-508478
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)8月25日
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997)2月26日
(86) 國際出願番号	PCT/EP95/03369
(87) 國際公開番号	WO96/06939
(87) 國際公開日	平成8年(1996)3月7日
(31) 優先権主張番号	9417366.3
(32) 優先日	1994年8月26日
(33) 優先権主張国	イギリス(GB)
(31) 優先権主張番号	9506466.3
(32) 優先日	1995年3月29日
(33) 優先権主張国	イギリス(GB)

(71) 出願人	ヘキスト、アクチングゼルシャフト ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、 マイン(番地なし)
(72) 発明者	ゼドラツェック、ハンス・ハラルト ドイツ連邦共和国マールブルク、ゾンネン ハント、3
(72) 発明者	ミュラー、ロルフ ドイツ連邦共和国マールブルク、ポイティ ールスシュトラーセ、8
(74) 代理人	弁理士 佐藤 一雄(外2名)

最終頁に統ぐ

(54) 【発明の名称】 細胞サイクル依存性である細胞に特異的な活性化合物を用いる中枢神経系の疾病の遺伝子療法

(57) 【要約】

中枢神経系の疾病的遺伝子治療を目的として、DNA配列を記載する。このDNA配列の本質的要素は、活性化配列、プロモーター・モジュールおよび活性物質の遺伝子からなっている。活性化配列は細胞に特異的な方法で、活性化した内皮細胞またはグリア細胞中で活性化される。この活性化は細胞サイクルに特異的な方法でプロモーター・モジュールによって制御される。活性物質は、神経成長因子、ドバミン代謝酵素、および/または神経細胞の保護因子である。記載されたDNA配列をウイルスまたは非ウイルスベクターに挿入し、これに、標識細胞に親和性を有するリガンドを補足する。

【特許請求の範囲】

1. 中枢神経系の疾患の予防または治療のための活性化合物であって、活性化配列と、細胞サイクルによって制御されるプロモーターモジュールと、神経特異製因子のDNA配列とからなるDNA構築物を含んでなる、活性化合物。

2. プロモーターモジュールがCDE-CHR-Inr要素を有し、かつc d c 2 5 Cプロモーター領域（ヌクレオチド配列：GCTGGCGGAAGGT TTGAATGGTCAACGCCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG）の位置 $\leq -20 \sim \geq +30$ を含んでなり、ここで、CDEが細胞サイクル依存性要素（ヌクレオチド配列：TGGCGG）からなり、CHRが細胞サイクル遺伝子相同領域（ヌクレオチド配列：GTTTGAA）からなり、Inrが開始部位（位置+1）および開始に重要な隣接配列からなるものであり、またはこのプロモーターモジュールの機能上活性な変異体および突然変異体である、請求の範囲第1項に記載の活性化合物。

3. 内皮細胞、またはグリア細胞で形成される転写因子によって制御される活性化配列を含んでなる、請求の範囲第1項に記載の活性化合物。

4. 活性化配列として、

CMVプロモーター、CMVエンハンサーまたはSV40プロモーター、または

脳に特異的な内皮グルコースー1ー輸送体、エンドグリン、VEGFレセプター1または2、レセプターチロシンキナーゼt i 1-1またはt i 1-2、B61レセプター、B61リガンド、エンドセリン、特にエンドセリンBまたはエンドセリン1、マンノースー6ーリン酸レセプター、IL-1 α またはIL-1 β 、IL-1レセプター、VCAM-1またはvon Willebrand因子、またはGATA-2のような結合部位が5' -TTATCT-3' である内皮細胞中

で優先的または選択的に活性である転写因子のオリゴマー化した結合部位、または

Schwann 細胞に特異的なペリアキシン、グルタミンシンテターゼ、グリア特異性タンパク質、グリア細胞タンパク質S100b、インターロイキン-6、5-

ヒドロキシトリプタミンレセプター、TNF α 、IL-10またはインシュリン様成長因子レセプター、または

VEGFのプロモーター配列、またはVEGFのエンハンサー配列、またはc-SRCまたはv-SRCのcDNA配列であってVEGF遺伝子を制御するもの

を含んでなる、請求の範囲第2項に記載の活性化合物。

5. 神経特異性因子のDNA配列が、

ニューロン成長因子、特にFGF、NGF、BDNF、NT-3、NT-4またはCNTF、または

TGF β 、可溶性TNFレセプター、IL-10、可溶性IL-1レセプター、または可溶性IL-6レセプター、またはL-1レセプターアンタゴニスト、またはサイトカイン（例えば、TGF β 、IL-10またはIL-1レセプターアンタゴニスト）または可溶性サイトカインレセプター（例えば、TNFレセプター、IL-6レセプターまたはIL-1レセプター）から形成された融合タンパク質、または免疫グロブリンのFc残基、または

チロシンヒドロキシラーゼまたはドーパデカルボキシラーゼをコードするものである、請求の範囲第1～3項のいずれか1項に記載の活性化合物。

6. 2個の同一または2個の異なる神経特異性因子のDNA配列を含み、2個のDNA配列が互いに内部リボソームエントリー部位のDNA配列を介して接続してされてなる、請求の範囲第1～5項のいずれか1項に記載の活性化合物。

7. ベクターに挿入された、請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の活性化合物。

8. ベクターがウイルスである、請求の範囲第7項に記載の活性化合物。

9. ウィルスがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、单纯ヘルペスウイルス、またはワクシニアウイルスである、請求の範囲第8項に記載の活性化合物。

10. プラスマミドに挿入された、請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の活性化合物。

11. コロイド分散系で調製された、請求の範囲第7～10項のいずれか1項に記載の活性化合物。

12. コロイド分散系がリポソームである、請求の範囲第11項に記載の活性化合物。

13. コロイド分散系がポリリシンリガンドである、請求の範囲第12項に記載の活性化合物。

14. 内皮細胞またはグリア細胞の膜構造に結合するリガンドで補足された、請求の範囲第7～13項のいずれか1項に記載の活性化合物。

15. リガンドが、

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗体断片であって、その可変ドメインによって、内皮細胞またはグリア細胞の膜構造に結合するものであるか、または

末端にマンノースを有する物質、サイトカインまたは成長因子、またはその断片または構成配列であって、内皮細胞またはグリア細胞上のレセプターに結合するもの

である、請求の範囲第14項に記載の活性化合物。

16. 膜構造が、

成長因子、例えばIL-1、FGF、PDGF、VEGF（特にFIT-1お

およびKDR）、TGF β 、インシュリンまたはインシュリン様成長因子（ILGF）のレセプターからなり、または

付着分子、例えばS1eX、LFA-1、MAC-1、LECAM-1またはVLA-4からなり、または

マンノース6-リン酸レセプターからなる、請求の範囲第15項に記載の活性化合物。

17. 静脈内または動脈内注射、傷害の部位への局所投与、または中枢神経系の腔部への注射のための製剤とされた、請求の範囲第1～16項のいずれか1項に記載の活性化合物。

【発明の詳細な説明】

細胞サイクル依存性である細胞に特異的な活性化合物を用いる

中枢神経系の疾病の遺伝子療法

技術分野

中枢神経系の疾病的遺伝子治療のためのDNA配列が記載されている。

このDNA配列の本質的要素は、活性化配列、プロモーター・モジュールおよび活性物質の遺伝子からなっている。

活性化配列は細胞に特異的な方法で、活性化した内皮細胞またはグリア細胞中で活性化される。この活性化は細胞サイクルに特異的な方法でプロモーター・モジュールによって制御される。活性物質は、神経成長因子、ドパミン代謝酵素、および／または神経細胞の保護因子である。記載されたDNA配列をウイルスまたは非ウイルスベクターに挿入し、これに、標識細胞に親和性を有するリガンドを補足する。

1. 中枢神経系および成長因子

個体発生を終了すると、神経細胞は十分に分化し、最早分裂することができない細胞からなっている。一般的には、それらは神経細胞本体と神経細胞突起とを特徴とし、求心性（デントライト(dendrites)）および遠心性（神経突起）の突起に識別される。遠心性の神経突起は、神経細胞当たり通常は1個しか形成されないが、シナプスを介してその標的器官（神経細胞または他の種類の体細胞）と接触する。

神経細胞の解剖学的構造および機能の保持は、ニューロン成長因子の存在下で行われる。

一般的な意味において、ニューロン成長因子は向神経性因子である理解すべき

である (Massague, Cell 49, 437(1987), Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191(1993), Ibanez et al., PNAS 89, 3060(1992), Sonoda et al., BBRC 185, 103 (1992) の総説)。これらの因子としては、第1表のニューロン成長因子が挙げられる。

狭義には、神経成長因子 (NGF) 類は、これらの因子に包含されるべきであ

る。

NGFは、NGFレセプターに結合することによって作用し、これは、特に知覚神経線維上に形成される。NGFは、細胞内に吸収され、退化的に神経細胞本体に輸送される(Johnson et al., J. Neurosci. 7, 923 (1987))。神経細胞本体では、NGFは、サイクリックアデノシン一リン酸(cAMP)を増加させ、続いてCa⁺⁺の流出を増加させ(Schubert et al., Nature 273, 718(1978)、更に、イノシトール脂質代謝によりジアシルグリセロールの方種およびタンパク質キナーゼCの活性化、およびイノシトール三リン酸放出によるCA⁺⁺の細胞内放出をもたらすと思われる(Abdel-Latif, Pharmacol. Rev. 38, 227(1986))。

特異的、特にシグナル導入タンパク質のリン酸化により、この誘導から、機能が変化する。これにより、軸索の成長に関与するタンパク質の形成が増加する。これらのタンパク質としては、チャーティン(chartin)タンパク質(Black et al., J. Cell Biol. 103, 545(1986))、タウタンパク質およびチューブリン(Drubin et al., J. Cell Biol. 101, 1799(1985))が挙げられる。従って、α-チューブリンおよびβ-チューブリン神経フィラメントタンパク質(NF-L, NF-M、およびNF-H)およびペリフェリン(Portier et al., Devi Neuroscience 6, 215(1983)), Parysek et al., J. Neurosci. 7, 781(1987))の合成が増加している。同時に、コリンアセチルトランスフェラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、およびニューロン特異性エノラーゼのような神経系で重要な酵素、の濃度も増加する(Vinore et al., J. Neurochemistry 37, 597(1981),

Rydel et al., J. Neurosci. 7, 3639(1987))。

また、ニューロテンシン(Tischler et al., Reg. Pept. 3, 415(1982))およびニューロペプチドY(Allen et al., Neurosci. Lett. 46, 291 (1984)のような神経伝達物質、およびアセチルコリンレセプター(Mitsuka et al., Brain Res. 314, 255(1984))およびエンセファリンレセプター(Inoue et al., J. Biol. Chem. 257, 9238(1982))のような神経伝達物質レセプターの濃度も増加する。同時に、シナプシン1の濃度が増加する(Romano et al., J. Neurosci. 7, 1300(1987))。

最終的分析では、NGFは神経細胞の機能状態を保持する。同時に、NGFは軸索の成長を開始し、促進する。この神経原性およびシナプス原性活性には、NGFが常に含まれていることが必要である(Smith, Science 242, 708(1988), Mitchison et al., Neuron 1, 761(1988))。

これは、特に毛様の神経親和性因子(CNTF)について報告されている(Lin et al., Drugs of the Future 19, 557(1994))。

神経成長因子の神経親和性活性は、特に神経細胞の損傷に関して、例えば軸索の外科的分断に関して、実験的に立証されている。CNTFを切断した神経の基端部に局所的に投与すると、外科的介入の後に死亡する神経細胞の割合は著しく減少する(Sendtner et al., Nature 345, 440(1990))。同時に、例えば神経ペプチド物質Pの濃度は、CNTFを投与すると、脊髄神経節で著しく上昇する。座骨神経に損傷を受けたラットは、CNTFを皮下投与すると、運動活性の回復が促進される(Lin et al., Drugs of the Future 19, 557(1994))。しかしながら、神経親和性因子の全身投与では、脊髄にありかつ血液-脳関門によって保護されている運動ニューロンが、軸索であって、関門の外側でも機能を示しあつこれによって神経親和性因子を吸収することができるものを有する場合にのみ有効である(Apfel et al., Brain Res. 605, 1(1993))。

神経細胞が、血液-脳関門の他の側、または反対側まで損傷を受けている場合には、神経親和性因子を頭蓋内に投与する必要がある。この方法では、視床軸索の分断の後の基部の視床ニューロンの逆行性変性(retrograde generation)は、実験により防止することができる(Clatterbuch et al., PNAS 90, 2222(1993))。しかしながら、再生過程を最良のものとする前提条件は、損傷を受けた神経細胞の部位に一定の神経親和性因子が存在することである。外科的損傷または損傷の軽減の時点に局所投与を行うことは可能であるが、これは外科的介入が一旦終了してしまえば、行うことは困難であるかまたはほとんど不可能である。例えば、鈍い外傷(blunt trauma)または毒素によるCNSに対する散在性の損傷では、目標を定めて投与を行う機会は極めて僅かに限定される。

外傷、免疫および毒素による影響を受けた結果として、グリア細胞が刺激され

てTNF α を産生することができる。このTNF α は、その時点では神経細胞およびグリア細胞にとって有毒である(Owens et al., Immunol. Today 15, 566(1994))。

活性化合物をCNSにできるだけ長時間存在させるため、神経親和性の活性化合物を発現する目的でイン・ビトロで導入した細胞（線維芽腫、内皮細胞および筋原細胞）を頭蓋内に注射する試みが行われている。この目的は、神経親和性の活性化合物を用いて、例えばパーキンソン病または痴呆症で外傷によりまたは退行的に損傷を受けた神経細胞の再生および機能を向上させることである。特に、パーキンソン病の場合には、イン・ビトロで導入された細胞を注射して、チロシンヒドロキシラーゼおよびドーパデカルボキシラーゼのような神経親和性酵素を分泌させ(Kopin, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32, 467(1993), Fisher et al., Physiol. Rev. 11, 582(1993), Jiao et al., Nature 362, 450(1993))、またはヒト胎児性のドパミン作用性の黒質ニューロンを注射する(Loewenstein, Bio/Technology 12, 1075(1994))。

しかしながら、この種の細胞は、限定された量でしか利用できない。一方、胎児性細胞の使用には、重大な倫理上の問題が起きている。

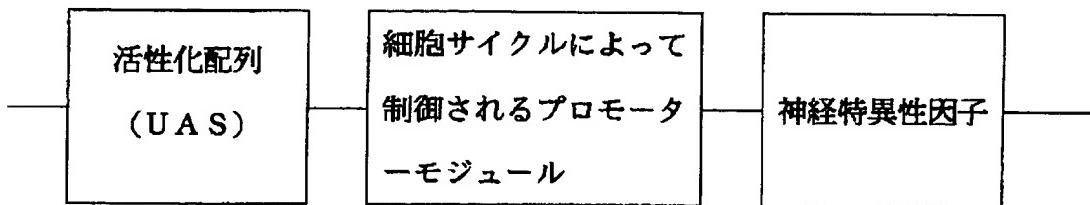
代替法として、ベクターを直接脳に注射して、脳に細胞を形質導入して、所望な活性化合物を発現させることの可能性が検討されている(During et al., Science 266, 1399(1994))。しかしながら、これらのベクターは細胞特異性をまったく示さないので、神経細胞がベクターによる感染またはトランスフェクションによって損傷を受ける危険性がかなりある。

2. 発明の説明

本発明は、活性化合物であって、医薬品として患者に局所および全身投与することができ、かつこれによって神経特異性因子を神経細胞の損傷部位に比較的長期間に亘って産生するものに関する。この種の神経特異性因子は、神経細胞をそれ以上損傷を受けることから保護しつつ神経細胞の再生をもたらす神経親和性因子であることができる。しかしながら、神経特異性因子は、チロシンヒドロキシラーゼおよびドーパデカルボキシラーゼのようなチロシンからドパミンの合成に

関与する酵素であることもできる。また、神経特異性因子は、TNF α を阻害しまたは中和する物質であることができる。

この活性化合物の中心成分は、下記の要素からなるDNA構築物である。



(本出願明細書の全文において、DNAは、相補性(cDNA)配列およびゲノムDNA配列の両方に共通の用語として用いられる。)

2.1. 活性化配列の選択

活性化配列(UAS=上流活性化配列)は、標的細胞において形成されまたは活性を有する転写因子と相互作用するヌクレオチド配列(プロモーター配列また

はエンハンサー配列)であって、内皮細胞またはグリア細胞において形成されまたは活性である転写因子と相互作用する配列と理解すべきである。

CMVエンハンサーまたはCMVプロモーター(E P 0 1 7 3 1 7 7)、SV40プロモーター、または当業者に知られている任意の他のプロモーター配列またはエンハンサー配列を、活性化配列として用いることができる。

しかしながら、本発明においては、好ましい活性化配列としては、特に内皮細胞またはグリア細胞で形成されるタンパク質をコードする遺伝子由来の遺伝子制御配列または要素が挙げられる。

a) 内皮細胞で活性化される活性化配列

これらのタンパク質の幾つかは、Burrows et al. (Pharmac. Therp. 64, 155(1994)およびPlate et al. (Brain Pthol. 4, 207 (1994))によって記載されている。特に、これらの内皮細胞特異性タンパク質としては、例えば下記のものが挙げられる。

脳特異性の内皮グルコースー1輸送体

脳の内皮細胞は、D-グルコースの脳内への内皮経由輸送を行う目的でこの輸送体を極めて強力に発現する(Gerhart et al., J. Neurosci. Res. 22, 464(1

989))。プロモーター配列はMurakami et al. (J. Biol. Chem. 267, 9300(1992))によって記載されている。

エンドグリン

エンドグリンは、シグナル伝達性ではないTGF β であると思われる(Gangos et al., J. Biol. Chem. 265, 8361(1990), Moren et al., BBRC 189, 356(1992), Cheifetz, J. Biol. Chem. 267, 19027(1992))。通常の内皮には少量含まれているが、増殖内皮では更に強力に発現する(Westphal et al., J. Invest. Derm. 100, 27(1993), Burrows et al., Pharmac. Ther. 64, 155(1994))。プロモーター配列は、(Bellon et al., Eur. J. Immunol. 23, 2340(1993), Ge et al., Gene 138, 201(1994))によって記載されている。

VEGF配列

2種類のレセプターが識別されている(Plate et al., Int. J. Cancer 59, 520(1994))：

*VEGFレセプター1 (f1t-1)

(de Vries et al., Science 255, 989(1992))

(細胞質部分にfms様チロシンキナーゼを含む)、および

*VEGFレセプター2 (f1t-2)

(Terman et al., BBRC 187, 1579(1992))

(細胞質部分にチロシンキナーゼを含む)

これらのレセプターは、内皮細胞上にほぼ独占的に見られるものである(Senger et al., Cancer Metast. Rev. 12, 303(1993))。

他の内皮特異性レセプターチロシンキナーゼ

*t1l-1またはt1l-2(Partanen et al., Mol. Cell Biol. 12, 1698(1992), Schnuerch and Risau, Development 119, 957(1993), Dumont et al., Oncogene 7, 1471(1992))

*B61レセプター(Eckレセプター)

(Bartley et al., Nature 368, 558(1994); Pandey et al., Science 268, 567(1995), van der Geer et al., Ann. Rev. Cell Biol. 10, 251(1994))

B 6 1

B 6 1 分子は、B 6 1 レセプターのリガンドを表す

(Holzman et al., J. Am. Soc. Nephrol. 4, 466(1993), Bartley et al.
, Nature 368, 558(1994))

エンドセリン、特に

*エンドセリンB (Oreilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18(1993)
, Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149(1993), O'Reilly et al., BBR
C 193, 834(1993))。プロモーター配列は、Yanasigawa et al., Nature 332, 41
1 (1988) およびBenatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149(1993)によって記
載されている。

*エンドセリン1 (Yanasigawa et al., Nature 332, 411(1988))。プロモ
ーター配列はWilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4654(1990)によって記載さ
れている。

エンドセリンレセプター、特にエンドセリンBレセプター (Webb et al., Mo
l. Pharmacol. 47, 730(1995), Haendler et al. J. Cardiovasc. Pharm. 20, 1
(1992))

マンノースー6-リン酸レセプター

(Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225(1994), Dahms et al., Cell 50
, 181(1987))

プロモーター配列は、Ludwig et al. (Gene 142, 311(1994)), Oshima et a
l. (J. Biol. Chem. 263, 2553(1988)) およびPohlmann et al. (PNAS USA 84, 5
575(1987))によって記載されている。

von Willebrand因子

プロモーター配列はJahroudi and Lynch (Mol. Cell. Biol. 14, 999(1994))
, Ferreira et al., Biochem. J. 293, 641(1993) およびAird et al., PNAS USA
92, 4567(1995) によって記載されている。

IL-1 α および IL-1 β

IL-1 α は活性化した内皮細胞によって産生される (Warner et al., J. Imm

unol. 139, 1911(1987))

プロモーター配列は、Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68(1986),

Tumer et al., J. Immunol. 143, 3556(1989), Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972(1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491(1990), Mori et al., Blood 84, 1688 (1994) およびHiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231(1993)によって記載されている。

I L - 1 レセプター

プロモーター配列は、Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993) によって記載されている。

血管細胞付着分子 (V C A M - 1)

内皮細胞でのV C A M - 1 の発現はリポ多糖類、T N F - α (Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558(1995)), I L - 4 (lademarco et al., J. Clin. Invest. 95, 264(1995)), I L - 1 (Mami et al., J. Clin. Invest. 92, 1866(1993))によって活性化される。

V C A M - 1 のプロモーター配列は、Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558 (1995), Ahmad et al., J. Biol. Chem. 270, 897 (1995), Neish et al., J. Exp. Med. 176, 1583(1992), ladernarco et al., J. Biol. Chem. 267, 16323 (1992) およびCybulsky et al., PNAS USA 88, 7859 (1991) によって記載されている。

合成活性化配列

内皮細胞中で優先的または選択的な活性を有する転写因子のオリゴマー化した結合部位からなる合成活性化配列を、天然内皮特異性プロモーターの代替物として用いることもできる。これらの合成活性化配列の一例は、転写因子G A T A - 2 であり、エンドセリン1における結合部位が遺伝子. . . T T A T C T. . . である(Lee et al., Biol. Chem. 266, 16188(1991), Dorfmann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279(1992) およびWilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854(1990))。

b) グリア細胞で活性化される活性化配列

また、好ましい活性化配列は、グリア細胞中で特に多量に形成されるまたは活性を有する転写因子と相互作用するヌクレオチド配列（プロモーター配列またはエンハンサー配列）であると理解すべきである。

これらの活性化配列としては、特に、グリア細胞で検出することができる下記のタンパク質をコードする遺伝子などに由来する遺伝子制御配列または要素が挙げられる。

*Schwann 細胞特異性タンパク質ペリアキシン

(Gillespie et al., Neuron 12, 497(1994))

プロモーター配列はGillespie et al. (Neuron 12, 497(1994))によって記載されている。

*グルタミンシンテターゼ

(Akimoto et al., Brain Res. 72, 9(1993)), Fressinaud et al, J. Cell Physiol. 149, 459(1991))。

プロモーター配列はChakrabarti et al. (Gene 153, 163(1995))およびBhandarie et al. (J. Biol. Chem. 266, 7784(1991))によって記載されている。

*グリア細胞特異性タンパク質

(グリア筋原線維酸性タンパク質=G F A P)

(Akimoto et al., Brain Res. 72, 9(1993))

プロモーター配列は、Kumanishi et al. (Acta Neuropath. 83, 569 (1992)), Besnard et al. (J. Biol. Chem. 266, 18877(1991), Reeves et al. (PNAS USA 86, 5178(1989)), Brermer et al. (Brain Res. 7, 277(1990))およびMasood et al. (J. Neurochem. 61, 160(1993))によって記載されている。

*S 100 b グリア細胞タンパク質

Shen et al., Mol. Brain Res. 21, 62 1994))

プロモーター配列は、Zimmer et al. (Brain Res. Bulletin 37, 417(1995))によって記載されている。

* I L - 6 (C N T F)

(Sparacio et al., J. Neuroimmunol. 39, 231(1992))

プロモーター配列はChernajoosky et al. (J. Cell. Biochem. Suppl. 0/13, 73(1989)), Ray et al. (Mol. Cell Biol. 10, 5736(1990)), Droogmans et al. (DNA Sequence 3, 115(1992)), Mori et al. (Blood 84, 2904(1994)), Liberman et al. (Mol. Cell. Biol. 10, 2327(1990))およびIshiki et al. (Mol. Cell. Biol. 10, 2757(1990))によって記載されている。

*5-HTレセプター

(Whitaker-Azmitia et al., Synapse 14, 201(1993))

プロモーター配列は、Elliott et al. (Neurochem. Int. 25, 537(1994)), Veldman et al. (Mol. Pharmac. 42, 439(1992)), Adham et al. (PNAS USA 90, 408(1993)), Mochizuki et al. (BBRC 185, 517(1992))およびJin et al. (J. Biol. Chem. 267, 5735(1992))によって記載されている。

*TNF α

(Perez et al., Cell 63, 251(1990), Merrill et al., J. Immunol. 151, 2132(1993))

プロモーター配列は、Takashiba et al. (Gene 131, 307(1993))およびvan der Ahe et al. (Nucl. Acids Res. 21, 5636(1993))によって記載されている。

*IL-10

(Owens et al., Immunol. Today 15, 566(1994))

プロモーター配列は、Kim et al. (J. Immunol. 148, 3618(1992)), Kube et al. (Cytokine 7, 1(1995)およびPlatzer et al. (DNA-Sequence 4, 399(1994)))

*インシュリン様成長因子レセプターIおよびII

プロモーター配列は、Cooke et al. (BBRC 177, 1113(1991)), Kim et al. (Mol. Endocrin. 5, 1964, (e1991)), van Dijk et al. ((Mol. Cell. Endocrin. 81, 81(1991), Raizis et al. (Biochem. J. 289, 133(1993))およびYu et al. (Nature 371, 714(1994))によって記載されている。VEGF

VEGFは、脈管形成した組織で、特に低酸素条件下で形成される(Berse et al., Mol. Biol. Cell 3, 211(1992), Finkenzeller et al., BBRC 208, 432(1995), Tischer et al. BBRC 165, 1198(1989), Leung et al., Science 246, 1306(1989), Ferrara et al., Endoc. Rev. 13, 18(1992))。VEGF遺伝子の遺伝子制御配列は、下記の通りである。

* VEGF遺伝子のプロモーター配列 (5' - 隣接領域)

(Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35(1994), Tischer et al., J. Biol. Chem. 266, 11947(1991)) または

* VEGF遺伝子のエンハンサー配列 (3' - 隣接領域)

(Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35(1994)、または

* c-Src 遺伝子

(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577(1995), Bonham et al., Oncogene 8, 1973), Parker et al., Mol. Cell. Biol. 5, 831(1985), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122(1985))、または

* v-Src 遺伝子

(Multhropadhyay et al., Nature 375, 577(1995), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122(1985), Gibbs et al., J. Virol. 53, 19(1985))

2.2 プロモーターモジュールの選択

細胞サイクルによって制御されるプロモーターモジュールは、例えばヌクレオチド配列-CDE-CHR-Inrであると理解すべきである。このプロモーターモジュールの本質的機能は、細胞サイクルのG0/G1相における活性化配列の機能を抑制し、S/G2相および続いて増殖細胞における細胞サイクル特異発現を確保することである。

プロモーターモジュールCDE-CHR-Inrは、ヒトcdc25CプロモーターのG2特異性発現の詳細な研究に関連して見いだされた。出発点は、細胞サイクルのG1相におけるプロモーターの遮断に関する制御要素（細胞サイクル依存性要素；CDE）を見いだしたことであった(Lucibelloら, EMBO J. 14, 132(1995))。ゲノムジメチル硫酸(DMS)フットプリント法および機能分析法

(functional analyses) (第1および2図) を用いて、CDEはG1に特異的にリプレッサー (CDE結合因子; CDF) に結合することによって非増殖 (G0) 細胞での転写を阻害することが示された。基底プロモーター(basal promoter)の領域に配置されているCDEは、その抑制機能において、「上流の活性化配列」 (UAS) によって変化する。

これにより、CDE結合因子は、細胞サイクル依存的に、すなわち非増殖細胞および細胞サイクルのG1相において、5'に結合した活性化物質タンパク質の転写活性化作用を阻害するという結論が得られた(第3図)。

この結論を更に実験によって確かめることができ、ウイルス性の非細胞サイクルによって制御される初期のSV40エンハンサーをcdc25最小プロモータ

ー(minimum promoter) (CDEおよび3'位の開始部位)と融合することによって、キメラプロモーターの細胞サイクルが明確に制御された(第4図)。次にcdc25Cエンハンサーについて検討したところ、細胞サイクル依存的にCDFによって制御される転写因子は、NF-Y (CBF) (Dorn et al., Cell 50, 863(1987), van Hjisduijnen et al., EMBO J. 9, 3119(1990), Coustry et al., J. Biol. Chem. 270, 468(1995))、Sp1 (Kadonagaら, TIBS 11, 10(1986))、および新規でありかつCBS7に結合する転写因子であることが明らかになった。この研究において得られたもう一つの興味ある知見は、cdc25Cエンハンサー内のNF-Yのみが、少なくとも1種類の他のNF-Y複合体またはCI Fと協同して効率的に転写を活性化することが見られたことである。NF-YもSp1も両方ともグルタミン含量の高い活性化物質のクラスに属し、抑制の機構(例えば、特定の基底転写因子またはTAFとの相互作用または干渉)に対する重要な情報を提供する。

cdc25C、サイクリンAおよびcdc2のプロモーター配列を比較したところ、幾つかの領域で相同性が見られた(第5図)。3種類のプロモーター(含まれている多様性は機能上関連はない)総てに保存されているのは、CDEだけでなく、隣接Yボックスも同様である。予想されるように、これらの領域は総てイン・ビボでタンパク質結合を示し、このタンパク質結合はCDEの場合には

細胞サイクル依存性であった。更に、3種類のプロモーターは総て、CDEの突然変異によって制御解除されることも示された（第2表）。c d c 2 5 C、サイクリンAおよびc d c 2配列を比較したところ、直ちにCDEの3'の領域に著しい類似性のあることも明らかになった（細胞サイクル遺伝子相同領域；CHR）（第5図）。この領域は機能上はCDEと同様に重要であるが（第2表）、それはイン・ビボでのDMSフットプリント法の実験では明らかではない。

これに対する可能な説明は、この因子とDNAの小さな溝(minor grooves)との相互作用である。電気泳動移動度シフト分析（EMSA）実験の結果は、CDEとCHRとは一緒にタンパク質複合体であるCDFに結合することを示している。これらの観察は、グルタミン含量の高い活性化物質のCDFによって媒介される抑制は、細胞サイクルによって制御される転写において頻繁に起きる機構であることを示している。

しかしながら、c d c 2 5 Cプロモーターを制御するのに重要なものは、CDE-CHR領域だけでなく、基底プロモーターのヌクレオチド配列（位置 $\leq -20 \sim \geq +30$ 、第1図を参照されたい）内の開始部位（位置+1）のものもあることは明らかである。YY-1のイン・ビトロでの結合部位を含むこの領域での突然変異(Seto およびShenk, Nature 354, 241(1991), Usheva およびShenk, Cell 76, 1115(1994))により、完全に制御解除される。CDE-CHRが基底プロモーターに近接していることを考慮すれば、その結果としてCDFは基底転写複合体と相互作用すると思われる。

2.3. 神経特異性因子の選択

a) ニューロン成長因子

本発明において、神経特異性因子は、ニューロン成長因子をコードするDNA配列であると理解すべきである。例えば、これらのニューロン成長因子としては、特に下記のものが挙げられる。

FGF

(Johnson et al., Adv. Cancer Res. 60, 1(1993)), Jay et al., Science 233, 541(g1986), Abraham et al., EMBO J. 5, 2523(1986), Science 233,

545(1986), Mergia et al., BBRC 138, 644 9(1986), Schweigerer, Nature 32 5, 257(1987), PNAS USA 84, 842(1987))

神経成長因子 (NGF)

(Haktzopoulous et al., Neuron 13, 187(1994), Takeda et al.,

Neuroscience 55, 23(1993), Cartwright et al., Brain Res. 15, 67(1992))

脳由来の神経親和性因子 (BDNF)

(Zhang et al., J. Neurobiol. 25, 1517(1994), Maisonpierre et al., Genomics 10, 558(1991), DNA Sequence 3, 49(1992), Timmusk et al., Neuron 10, 475(1993))

ニューロトロフィン-3 (NT-3)

(Hallboeoek et al., Eur. J. Neurosci. 5, 1(1993), Rodriguez-Tebar et al., Philosoph. Transact. Roy. Soc. Biol. Sci. 331, 255(1991), Leing aertner et al., Eur. J. Neurosci. 6, 1149(1994))

ニューロトロフィン-4 (NT-4)

(Ibanes et al., PNAS 89, 3060(1992), Ny et al., PNAS 89, 3060(1992))

毛様神経親和性因子 (CNTF)

(Ishiki et al., New Biologist 3, 63(1991), Ray et al., Mol. Cell Biol. 9, 5537(1989), Leung et al., Neuron 8/6, 1045(1992), Bootha et al., Gene 146, 303(1994))

b) 酵素

更に、神経特異性因子は、例えば下記のものをコードする cDNA配列である。

チロシンヒドロキシラーゼ

(Goc et al., Mol Cell Neurosci. 3, 383(1992), Boularand et al., J. Biol. Chemistry 270, 3748(1995))、または

ドーパデカルボキシラーゼ

(Maras et al., Eur. J. Biochem. 201, 385(1991), Nayatsu, Neurosci

Res. 12, 315(1991), Ichinose et al., Biochem. 31, 11546(1992), Levanthal et al., Mol. Brain Res. 17, 227(1993), Sumiichinose et al., J. Neurochem. 64, 514(1995))

c) サイトカインおよびそのインヒビター

神経特異性因子は、TNF α の神経毒性効果を抑制したまたは中和するタンパク質をコードするDNA配列であるとも理解すべきである。これらのタンパク質としては、例えば下記のものが挙げられる。

TGF β

(Massague, Ann. Rev. Cell. Biol. 6, 597(1990), Kondiah et al. J. Biol. Chem. 265, 1089(1990), Gamier et al., J. Mol. Biol. 120, 97(1978))

TGF β は、TNF α によって媒介される細胞毒性を抑制する(Merrill et al., J. Immunol. 151, 2132(1993), Quin et al., Armals of Surgery 220, 508(1994))

可溶性TNFレセプター

(Nophar et al., EMBO J. 9, 3269(1990), Himmller et al., DNA Cell Biol. 9, 705(1990), Aggarwa et al., Nature 318, 665(1985), Gray et al., PNAS 87, 7380(1990), Tartaglia et al., Immunol. Today 13, 151(1992), Loether et al., Cell 61, 351(1990), Schall et al., Cell 61, 361(1990), Smith et al., Science 248, 1019(1990), Goodwin et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3020(1991))

TNFレセプターは、TNF α を中和する。総説: Olsson et al., Eur. Cytokine Netw. 4, 169(1993))。

IL-10

(Moore et al., Science 248, 1230(1990), Vieira et al., PNAS USA 88, 1172(1991), Kim et al., J. Immunol. 148, 3618(1992))

IL-10は、IFN γ 、TNF α 、IL-2およびIL-4の形成を抑

制する(Schlaak et al., Scand. J. Immunol. 39, 209(1994), Vieira et al., PNAS USA 88, 1172(1991), Benjamin et al., Leuk. Lymph. 12, 205(1994))

可溶性IL-1レセプター

*IL-1レセプターI

(Sims et al., PNAS USA 86, 8946(1989), Dower et al., J. Exp. Med. 162, 501(1985), Chizzonite et al., PNAS 86, 8029(1989)

*IL-1レセプターII

(McMahan et al., EMBO J. 10, 2821(1991), Sims et al., Science 241, 585(1988))

可溶性IL-1レセプターは、IL-1の活性を中和する(Colotta et al., Immunol. Today 15, 562(1994), Sims et al., Clin. Immunol. Immunopath. 72, 9(1994))

IL-1レセプターアンタゴニスト

(Eisenberg et al., Nature 343, 341(1990), Carter et al., Nature 344, 633(1990))

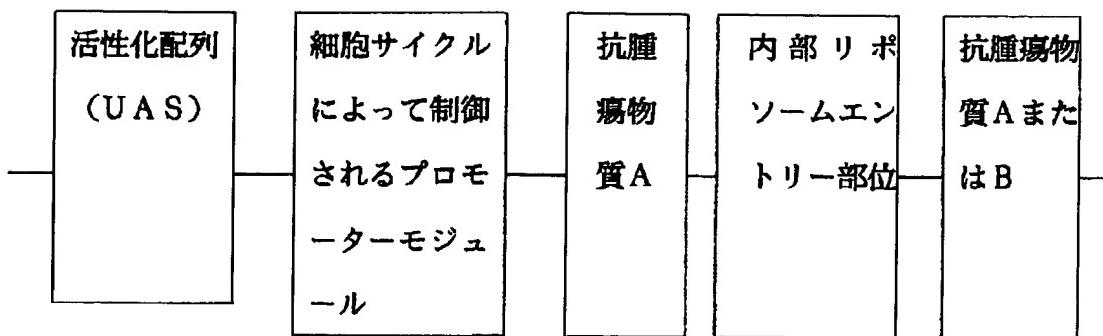
可溶性IL-6レセプター

(Mackiewicz et al., Cytokine 7, 142(1995))

しかしながら、本発明において、一方では、上記のサイトカインおよび成長因子、またはレセプターの細胞外残基と、他方ではヒト免疫グロブリンのFc残基との間に形成した融合タンパク質のDNA配列を、活性物質として用いることができる。この種のDNA配列およびその調製は、EP 0 464 633 A 1号明細書に記載されている。

2.4. 数個の神経特異性因子の組合せ

本発明は、活性化合物であって、同一な神経特異性因子(A, A)または異なる神経特異性因子(A, B)のDNA配列の組合せが含まれているものにも関する。2個のDNA配列の発現のためには、「内部リボソームエントリー部位」(IRES)のcDNAは、制御要素として挿入するのが好ましい。



この種のIRESは、例えばMountfordおよびSmith (TIG 11, 179 (1995)、Kaufmanら, Nucl. Acids Res. 19, 4485(1991)、Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992)、およびDirks et al., Gene 129, 247(1993)、PelletierおよびSonenberg, Nature 334, 320 (1988)、Sugimoto et al., BioTech. 12, 694(1994)によって記載されている。

従って、ポリオウイルスのIRES配列のcDNA (5' URTの位置 \leq 140~ \geq 630; Pelletier and Sonenberg, Nature 334, 320(1988))を用いて、抗炎症物質AのDNA (3'末端) および抗炎症物質BのDNA (5'末端) を連結することができる。

組み合わせによっては、この種の活性化合物は本発明の意味において相加的 (A+A, A+B 1) または相乗的效果を示す。

2.5. ベクターの構築

新規DNA構築物を、当業者が慣れた方法で完全なベクターとする。このベクターはウイルスまたは非ウイルス性のものであることができる。例えば、新規なDNA構築物をウイルスベクターに挿入し (この場合には、D. Jolly, Cancer

Gene Therapy 1, 51 (1994) を参照されたい) 、またはプラスミドとして用いる。ウイルスベクターまたはプラスミドをコロイド状分散液、例えばリポソームと複合体を形成し(Farhood et al., Annals of the New York Academy of Science 716, 23(1994))、またはポリリシン/リガンド抱合体または他の慣用されている補助物質と共に医薬品として処方することもできる(Curiel et al., Annals of the New York Academy of Science 716, 36(1994))。

2.6. リガンドの選択

ウイルスおよび非ウイルス性ベクターを、リガンドにより補足することができる。増殖する内皮細胞の表面に結合する物質は、例えばポリリシン／リガンド抱合体におけるリガンドとして好ましい。これらの物質としては、例えばBurrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155(1994)) またはE P O 4 0 8 8 5 9 A 2 号明細書9)に記載されているように、内皮細胞の膜構造に対する抗体または抗体断片が挙げられる。これらの物質としては、特にVEGFレセプターに対する抗体が挙げられる。

ネズミモノクローナル抗体は、人体に適用される形態で用いるのが好ましい。人体への適用は、Winter et al. (Nature 349, 293(1991)) およびHoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19(1993))によって記載された方法で行われる。抗体断片は、当該技術分野の状況に従って、例えばWinter et al. (Nature 349, 293(1991))、Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19(1993))、Girol (Mol. Immunol. 28, 1379(1991) またはHuston et al. (Int. Rev. Immunol. 10, 195(1993)) によって記載された方法で調製される。

更に、これらの物質としては、内皮細胞上の膜構造または膜レセプターに結合する総ての物質が挙げられる。活性物質としては、例えば、成長因子、またはそれらの断片またはそれらの構成配列であって、内皮細胞によって発現されるレセプター、例えばPDGF、bFGF、VEGFおよびTGF β に結合するものが挙げられる(Pusztais et al., J. Pathol. 169, 191(1993))。

更に、これらの物質としては、活性化したおよび／または増殖する内皮細胞に結合する付着分子が挙げられる。この種の付着分子、例えばSLe x 、LFA-1、MAC-1、LECAM-1 またはVLA-4 は、既に記載されている (Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483(1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175(1990) およびHonn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353 (1992) の総説)。

更に、グリア細胞の表面に結合する物質は、リガンドと考えるべきである。

これらの物質としては、例えばMirsky et al. (Cell and Tissue Res. 240, 723(1985))、Coakham et al. (Prog. Exp. Tumor Res. 29, 57(1985))およびMcKeever et al. (Neurobiol. 6, 119(1991))によって報告されているように、グリア細胞の膜構造に対する抗体または抗体断片が挙げられる。これらの膜構造としては、神経付着分子、例えばN-CAM、特にそのポリペプチド鎖C (Nybroe et al., J. Cell Biol. 101, 2310(1985))。

これらの物質としては、グリア細胞の膜構造または膜レセプターに結合する総ての活性化合物が挙げられる。例えば、これらの物質としては、末端にマンノースを有しつつマンノース6-リン酸レセプター (Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225(1994))、インシュリンおよびインシュリン様成長因子 (Merrill et al., J. Clin. Endocrin. Metab. 71, 199(1990))、PDGF (Ek et al., Nature 295, 419(1982))に結合するもの、および関連の膜レセプターに結合するこれらの成長因子の断片が挙げられる。

2.7. 活性化合物の調製

新規な活性化合物の調製を、下記の実施例によって更に詳細に説明する。

a) キメラプロモーターエンドセリン-1 CDE-CHR-Inr の構築

ヒトエンドセリン-1プロモーター (位置 $\leq -170 \sim \geq -10$) またはTA TAボックスを除去することによって切断した変異体 (位置 $\leq -170 \sim \geq -40$) をその3'末端で、ヒトcdc25C遺伝子のCDE-CHR-Inrモジュール (位置 $\leq -20 \sim \geq +121$) の5'末端に連結する (第6図)。この連結は、当業者に知られておりかつ市販されている酵素を用いて行われる。

b) 活性化合物の中心成分を含むプラスミドの構築

この方法で調製したキメラエンドセリン-1リプレッサーモジュール転写単位を、その3'末端で、長さが152アミノ酸のIL-1レセプターアンタゴニストの完全コード領域を含むDNAの5'末端に連結する (位置 $\leq 25 \sim \geq 557$) Eisenberg et al., Nature 343, 341(1990))。このDNAは、分泌に必要なシグナル配列 (25個のN-末端アミノ酸) をも含んでいる。転写制御単位および

I L - 1 レセプターアンタゴニストDNAを、直接(Yovandich et al., Hum. Gene Ther. 6, 603(1995))またはコロイド分散液系で用いて、イン・ビボでのトランسفァーを行うことができるpUC19/19またはBlue script由来のプラスミドにクローンする。

または、一緒に結合した転写制御単位およびI L - 1 レセプターアンタゴニストDNAを、当業者によく知られているウイルスベクターまたは他の非ウイルスベクターに移すことができる。

2.8. 活性化合物の活性

例えば腫瘍の部位で局所投与の後、または頭蓋内またはクモ膜下投与、または全身、好ましくは静脈内または動脈内投与の後、本発明の活性化合物は、組織特異性エンハンサーおよび基底プロモーターによって、独占的にではないにしても

主に増殖する内皮細胞だけまたは増殖するグリア細胞が、神経特異性因子を分泌することができるようになる。この種の内皮細胞の増殖またはグリア細胞の増殖は、神経の損傷をも同時に引き起こした領域および組織損傷に対する反応として予想されるものである。従って、新規な活性化合物は、神経損傷の部位における神経特異性因子の濃度を高くすることができる。

活性化合物の細胞特異性およびその細胞サイクル特異性により高度の安全性が約束されるので、これを高投与量で用い、必要ならば、数日または数週間の間隔で繰り返し用いて、神経損傷の治療を行うこともできる。

第1図～第6図の説明

第1図：

イン・ビボで見いだされたタンパク質結合部位を有するcdcc25Cプロモーター領域のヌクレオチド配列(ゲノムDMSフットプリント法；●(黒丸)：完全な構成上の保護；○(白丸)：部分的な構成上の保護；*(星印)：細胞サイクルによって制御されたG1に特異的な保護)。CBS：構成結合部位；CDE：細胞サイクル依存性要素。灰色に下塗した領域は、Y_cボックス(NF-Y結合部位)を示している。開始部位は、黒四角形で示す。

第2図：

c d c の突然変異による G_oにおける特異的な c d c 2 5 C プロモーターの抑制解除。

第3図：

C D E による c d c 2 5 C エンハンサーの制御を模式的に表したもの。

第4図：

C D E による S V 4 0 エンハンサーの G_o／G₁特異的抑制。

第5図：

c d c 2 5 C 、サイクリンAおよびc d c 2 プロモーターでのC D E - C H R

領域および5' Y c ボックスにおける相同性。

第6図：

ヒトエンドセリン-1プロモーター、C D E およびC H R リプレッサー要素を含む3' 融合プロモーターモジュール、およびエフェクターとしてのヒトβ-グルクロニダーゼのD N A (完全コード領域、位置<25～≥557 : Eisenberg et al., Nature 343, 341(1989)) の様々な残基からなるキメラ構築物。位置の表示は、それぞれ、エンドセリン1遺伝子に対するWilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854 (1990) の表示、およびLucibello et al., E M B O J. 15, 132(1995)によって使用されたc d c 2 5 C に対する系を表す。

第1表： ニューロン成長因子

	形成部位	作用部位
表皮成長因子類		星状細胞
神経線維腫由来の 成長因子 (S D G F)	Schwann 細胞	Schwann 細胞 線維芽腫
ヘパリン結合成長因子類		
酸性線維芽腫成長因子 (a F G F)	遍在	遍在
塩基性線維芽腫成長 因子 (b F G F)	遍在	遍在
神経成長因子類		
神経成長因子 (N G F)	Schwann 細胞 ニューロン メラノサイト 脳のコリン作動性 ニューロン	末梢ニューロン
脳由来の神経親和性因子 (B D N F)	ニューロン グリア細胞	脳のドパミン作動性 ニューロン
ニューロトロフィン-3, -4 (N T - 3, N T - 4)	多数の細胞の種類	末梢自己刺激感応性 ニューロン
毛様神経親和性因子 (C N T F)		末梢神経細胞

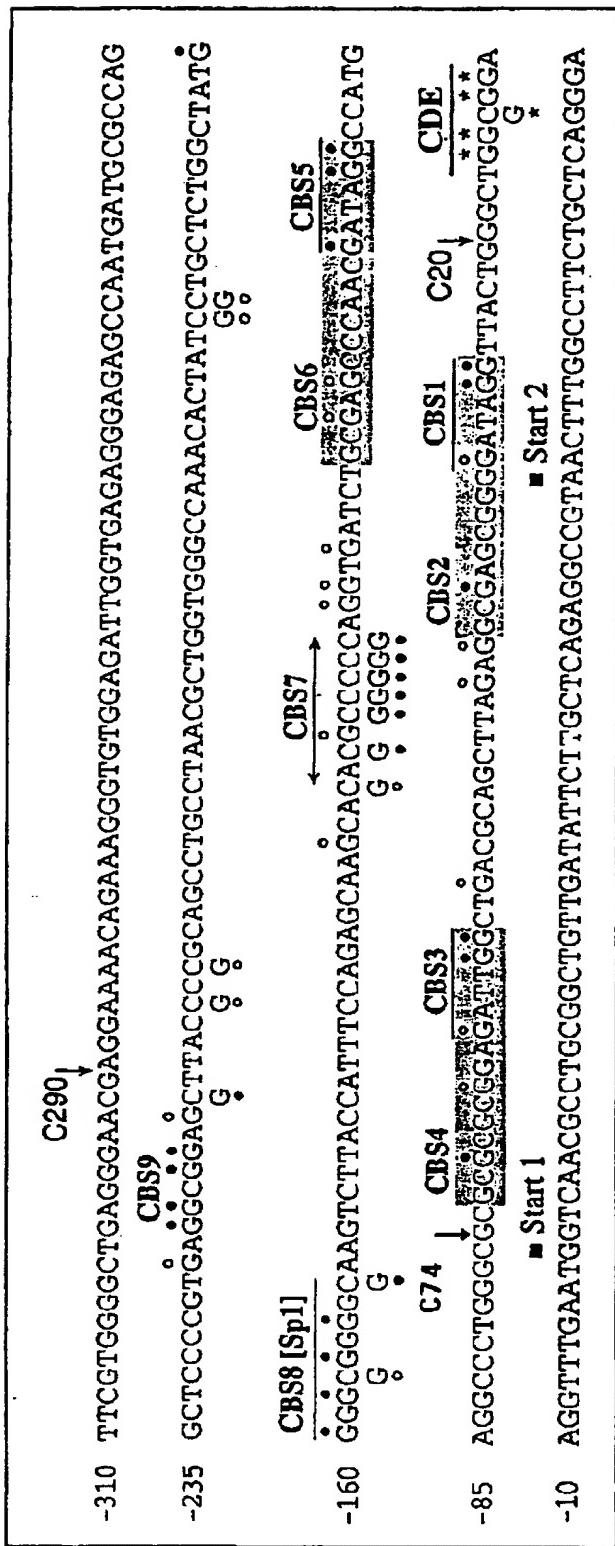
第2表： c d c 25C、サイクリンAおよびc d c 2の細胞サイクル制御転写におけるCDEおよびCHRの役割

第2表

	G ₀	成長	要因
w t			
c d c 25C	0.8	13.1	17.5
サイクリンA	0.7	27.1	41.7
<u>c d c 2</u>	<u>1.0</u>	<u>41.2</u>	<u>41.2</u>
m CDE (-13)			
c d c 25C	7.6	11.6	1.5
サイクリンA	13.4	23.9	1.8
<u>c d c 2</u>	<u>11.3</u>	<u>33.9</u>	<u>3.0</u>
m CHR (-6/-3)			
c d c 25C	14.4	21.0	1.5
サイクリンA	15.5	28.3	1.8
<u>c d c 2</u>	<u>18.6</u>	<u>38.6</u>	<u>2.1</u>

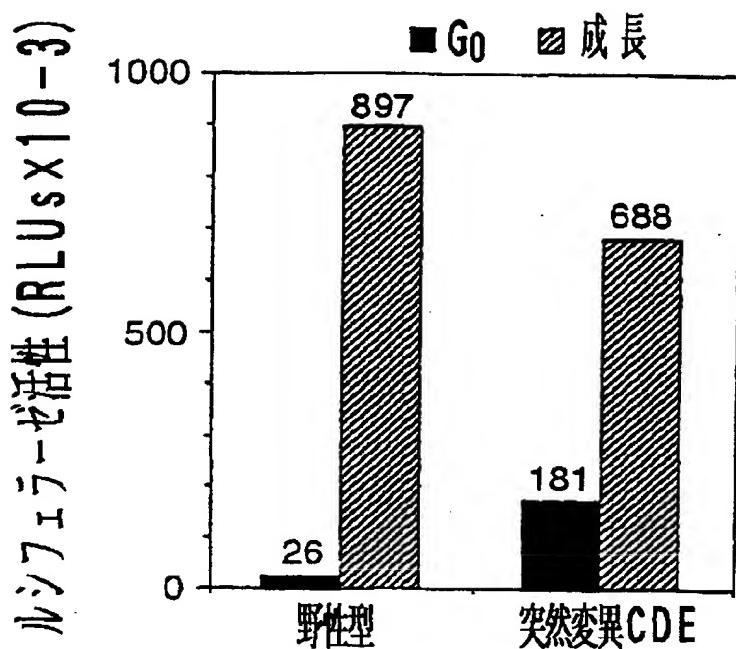
H I H 3 T 3 細胞での遷移トランスフェクションの結果は、RLUs/1000として表す。m CDE：突然変異したCDE（位置：-13：G→T）；m CHR：突然変異したCHR位置：-6～-3）

【図1】



1
FIG.

【図2】



cdc25c プロモーター断片

FIG. 2

【図3】

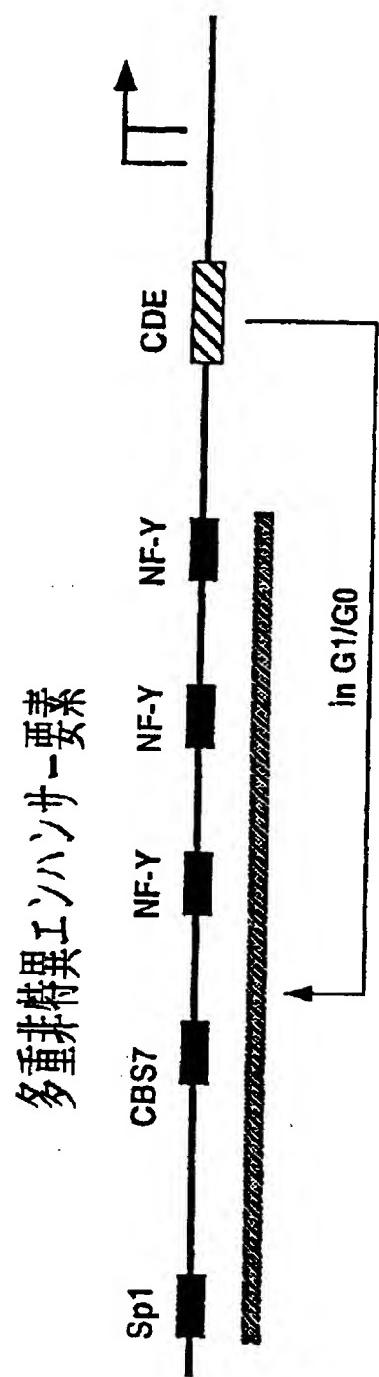


FIG. 3

【図4】

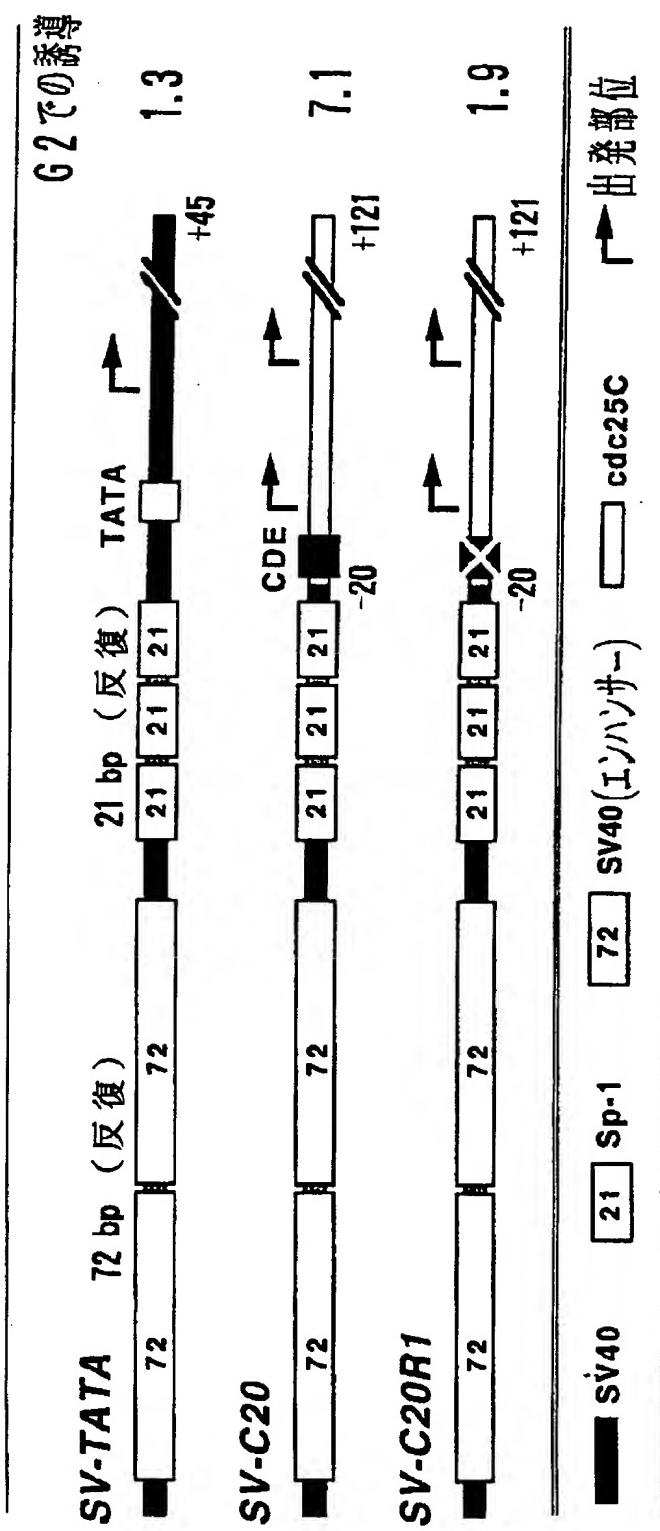


FIG. 4

【図5】

	<i>Y_c-Box 2</i>	<i>Y_c-Box 1</i>	
<i>cdc25C</i>	GCGGAACTTGCTGACCG GGCTCTCTGCTGCTT	GCGGAGGGGCGTTCGCT GGGTACCCGATTGCTT	8 bp CDE - CHR
<i>cdc2</i>		GGGGTACCCGATTGCTT	17 bp CDE - CHR
<i>cyclin A</i>	CTGTCGCCTTGAA <u>TGACGTCA</u>	CGAGGGTTTTCAATTGGT	9 bp CDE - CHR
		ATF	

FIG. 5

【图 6】

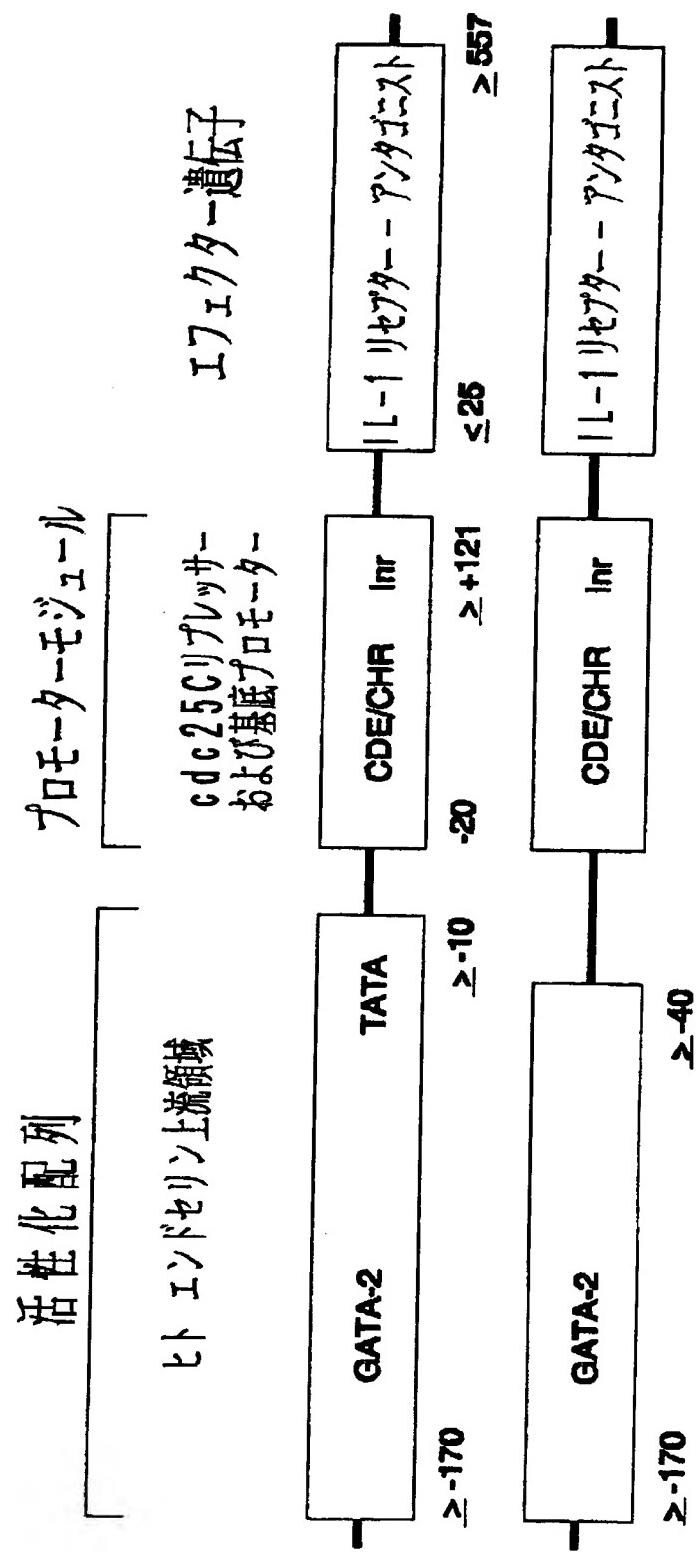


FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Item: Application No PCT/EP 95/03369
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/85 A61K48/00 C07K14/475 C12N15/86 C12N15/88		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 08026 (RHONE-POULENC RORER S.A./INSERM) 14 April 1994 see examples 9-11 ---	1-17
A	BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 87, no. 1(supplement), June 1994 page 124 F.EHLERT ET AL. 'Cell cycle-regulated transcription of the human cdc25C gene is controlled by a novel regulatory element' see abstract 483 ---	1-17
A	WO,A,94 04137 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY) 3 March 1994 see page 28 - page 29 -----	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
8 December 1995	08.01.96	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Cupido, M	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03369

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B-	4818093	26-04-94
		CA-A-	2145535	14-04-94
		EP-A-	0669987	06-09-95
		FI-A-	951404	24-03-95
		NO-A-	951121	23-03-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9404137	03-03-94	AU-B-	5086393	15-03-94
-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号 F I
A 61 K 39/395 A 61 K 37/24
C 07 K 14/475 37/02

(81) 指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AP (KE, MW, SD, SZ, UG),
AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, C
Z, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR
, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN,
MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, T
J, TT, UA, US, UZ, VN